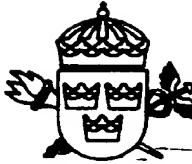


28 Rec'd PCT/PTO

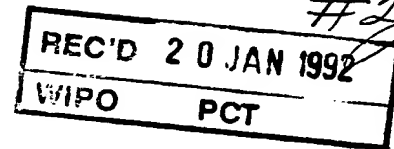
1 0 JUL 1992

PCT/SE91/00892

08/070, 455
#2
11-22-93



PATENT- OCH
REGISTERINGSVERKET



PRIORITY DOCUMENT



- (71) Sökande Amylogene Handelsbolag c/o Svalöv AB, Svalöv SE
Applicant(s)
- 21) Patentansökningsnummer 9004096-5
Patent application number
- 86) Ingivningsdatum 1990-12-21
Date of filing

Härmed intygas att bifogde kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registeringsverket i ovannämnda ansökan.

This is to certify that annexed hereto is a true copy of documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the patent application above.

Ex officio

Gunilla Kärrbäck
Gunilla Kärrbäck
Datum
Date 1991-12-20

Åsa Dahlberg
Åsa Dahlberg

Avgift
Fee

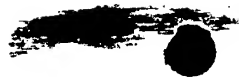
PATENT- OCH
REGISTERINGSVERKET
Sweden

Postadress/Address
Box 5055
S-102 42 Stockholm

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PATOREG S

Telefax
08-666 02 86



1911

1

1911

1911

1911

1911

1911

1911

GENTEKNIKSK FÖRÄNDRING AV POTATIS FÖR BILDNING AV STÄRKELSE
AV AMYLOPEKTINTYP

Föreliggande uppfinning avser genteknisk förändring
5 av potatis, vilken resulterar i bildning av praktiskt ta-
get enbart stärkelse av amylopektintyp i potatisen. Den
gentekniska förändringen innebär införande av ett genfrag-
ment i potatis, vilket genfragment omfattar delar av
ledarsekvens och translationsstart samt en del av genen
10 som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas. Insatt
i antisens-riktning. Antisens-fragmentet har den i SEQ ID
nr 1 visade strukturen.

Uppfinningens bakgrund

Stärkelse i olika former har stor betydelse inom
15 livsmedels- och pappersindustrin. I framtiden kommer stjär-
kelse också att utgöra en stor potential för tillverkning
av i naturen nedbrytbara polymerer, t ex för användning
som förpackningsmaterial. Många olika stärkelseprodukter
är kända, vilka framställts genom derivatisering av nativ
20 stärkelse med ursprung i bl a majs och potatis. Stärkels
från potatis respektive från majs konkurrerar inom d
flesta marknadsområden.

I potatisknölen utgör stärkelse den största andelen
av torrsubstansen. Ca 1/4 till 1/5 av stärkelsen i potatis
25 utgöres av amylos, medan resten av stärkelsen är amylopek-
tin. Dessa båda komponenter av stärkelsen har olika an-
vändningsområden och det är därför av stort intresse att
kunna framställa antingen rent amylos eller rent amylop k-
tin. De båda stärkelsekomponenterna kan framställas ur
30 vanlig stärkelse, vilket kräver många processteg och därig-
enom blir dyrbart och omständligt.

Det har nu visat sig att det med genteknologi är möj-
ligt att förändra potatis så att knölarna endast produce-
rar huvudsakligen stärkelse av den ena eller andra typen.
35 Härigenom skapas en stärkelsekvalitet som kan konkurrera
på de områden där potatisstärkelse idag normalt ej an-
vänds. Stärkelse från sådan gentekniskt förändrad potatis

har stor potential som livsmedelstillsats, eftersom den inte genomgått någon kemisk modifieringsprocess.

Stärkelsesyntes

Syntesen av stärkelse och regleringen därav studeras för närvarande med stort intresse, både på grundforskningsnivå och med tanke på industriell tillämpning. Fastän man känner till mycket om vissa enzyms medverkan i omvandlingen av sackaros till stärkelse, är stärkelsens biosyntes ännu inte klarlagd. Genom undersökning av framförallt majs har man dock kunnat klarlägga en del av syntesvägarna och de enzymer som deltar i dessa reaktioner. D viktigaste stärkelsesyntetiserande enzymerna för uppbyggnad av stärkelsekornen är stärkelsesyntas och "branching enzyme". I majs har man hittills påvisat och studerat tre former av stärkelsesyntas, varav två är lösliga och en är olösligt associerad till stärkelsekornen. Även "branching enzyme" består av tre former, vilka troligen kodas av tre olika gener (Mac Donald & Preiss, 1985; Preiss, 1988).

waxy-genen i majs

Syntesen av stärkelsekomponenten amylos sker huvudsakligen genom inverkan av stärkelsesyntaset alfa-1,4-D-glukan-4-alfa-glukosyltransferas (EC 2.4.1.21), som är associerat med stärkelsekornen i växtcellen. Genen som kodar för detta stärkelsekornbundna enzym kallas "waxy" (= wx^+), medan enzymet benämns "GBSS" (granule bound starch synthase).

waxy-locus i majs har grundligt karakteriserats, såväl genetiskt som biokemiskt. waxy-genen, belägen på kromosom 9, kontrollerar produktionen av amylos i endosperm, pollen och embryosäck. Stärkelsen som bildas i endosperm hos normal majs med wx^+ -allelen består till 25% av amylos och till 75% av amylopektin. En mutant form av majs har påträffats, i vilken endospermet innehåller en mutation lokaliserad till wx^+ -genen, varför inget funktionsdugligt GBSS syntetiseras. Endosperm från denna mutantmajs innehåller därför enbart amylopektin som stärkelsekomponent. Denna sk waxy-mutant innehåller således varken GBSS ll r amylos (Echt & Schwartz, 1981).

- GBSS-proteinet kodas av wx⁺-genen i cellkärnan men transporteras till och är verksamt i amyloplasten. Preproteinet består därför av två komponenter, nämligen en 7 kD transitpeptid för transport av proteinet över amyloplasmembranet samt det egentliga proteinet, som är 58 kD. Den kodande regionen av wx⁺-genen i majs är 3,7 kb lång och består av 14 exoner och 13 introner. Flera av regulations-signalerna i promotorregionen är kända och två olika polyadenyleringssekvenser har beskrivits (Klösgen et al, 1986; Schwartz-Sommer et al, 1984; Shure et al, 1983).

Amylosenzym i potatis

- I potatis har man identifierat ett 60 kD protein, som utgör det huvudsakliga stärkelsekornbundna proteinet. Eftersom antikroppar mot detta potatisenzym korsreagerar med GBSS från majs antar man att det är det stärkelsekornbundna syntaset (Vos-Scheperkeuter et al, 1986). Genen för potatis-GBSS har dock hittills inte karaktäriserats i samma utsträckning som waxy-genen i majs, varken vad gäller lokalisering eller uppbyggnad.
- Naturligt förekommande waxy-mutanter har beskrivits för korn, ris och sorghum förutom för majs. I potatis har man inte funnit någon naturlig mutant, men däremot har man framställt en mutant genom röntgenbestrålning av blad från en monohaploid (n=12) planta (Visser et al, 1987). Stärkelse isolerad från knölar av denna mutant innehåller varken GBSS-proteinet eller amylos. Mutanten betingas av en enkel recessiv gen och benämns amf. Den kan liknas vid waxy-mutanter av andra växtslag eftersom såväl GBSS-proteinet som amylos saknas. Stabiliteten av kromosomtalet försvagas dock då detta fördubblas till det naturliga talet (n=48), vilket kan förorsaka negativa effekter på potatisplantorna (Jacobsen et al, 1990).

Inhibering av amylosproduktion

- Syntesen av amylos kan drastiskt reduceras genom inhibering av det stärkelsekornbundna stärkelsesyntaset, GBSS, vilket katalyserar bildningen av amylos. Denna inhibering resulterar i att stärkelsen huvudsakligen kommer att bestå av amylopektin.

Inhibering av bildningen av nzym kan åstadkommas på flera sätt, t ex genom:

- mutagenbehandling, vilket medför en förändring av gen-sekvensen som kodar för bildningen av enzymet
- 5 - införlivande av en transposon i gensekvensen som kodar för enzymet
- genteknisk modifiering så att genen som kodar för enzy-met inte uttrycks, t ex antisens-geninhibering.

I fig 1 visas ett specifikt undertryckande av normal
10 genexpression genom att en komplementär antisens-nukleotid får hybridisera med mRNA för en målgen. Antisens-nukleoti-den är således antisens-RNA, som transkriberas in vivo från en "omvänd" gensekvens (Izant, 1989).

Genom användning av antisens-teknik har olika gen-
15 funktioner i växter inhiberats. Antisens-konstruktionen för chalkonsyntas, polygalakturonas och fosfinotricin-ace-tyltransferas har använts för att inhibera motsvarand en-zym i växtslagen petunia, tomat respektive tobak.

Inhibering av amylos i potatis

20 I potatis har man tidigare försökt inhibera syntesen av det stärkelsekornbundna stärkelsesyntaset (GBSS-prot i-net) med en antisens-konstruktion motsvarande genen som kodar för GBSS (i fortsättningen benämns denna gen "GBSS-genen"). Hergersberger (1988) beskriver en metod, genom
25 vilken en cDNA-klon för GBSS-genen i potatis har isolerats med hjälp av en cDNA-klon för wx⁺-genen i majs. En anti-sens-konstruktion baserad på hela cDNA-klonen överfördes till bladdiskar av potatis med hjälp av Agrobacterium tumefaciens. I mikroknölar inducerade in vitro från r g -
30 nererade potatisskott observerades en varierande och mycket svag reduktion av amyloshalten, visad i diagram. Någon fullständig karaktärisering av GBSS-genen ges inte.

Genen för GBSS-proteinet i potatis har ytterligare karaktäriserats genom att en genomisk wx⁺-klon undersökts
35 med restriktionsanalys. Dock har klonens DNA-sekvens inte bestämts (Visser et al, 1989).

Ytterligare försök med en antisens-konstruktion motsvarande GBSS-genen i potatis har rapporterats. Antisens-konstruktionen, som bygger på en cDNA-klon tillsammans med CaMV 35S-promotorn, har transformerats med hjälp av Agrobacterium rhizogenes. Transformationen resulterade enligt uppgift i lägre amylosinnehåll i potatisen, men inga värden redovisas (Flavell, 1990).

Ingen av de hittills använda metoderna för genteknisk förändring av potatis har resulterat i potatis med praktiskt taget ingen stärkelse av amylostyp.

Ändamålet med uppfinningen är därför att åstadkomma ett så gott som fullständigt undertryckande av bildning av amylos i potatisknölar.

Sammanfattning av uppfinningen

Enligt uppfinningen inhiberas funktionen av GBSS-genen och därmed amyloproduktionen i potatis genom användning av helt nya antisens-konstruktioner. För bildning av antisens-fragmentet enligt uppfinningen utgår man från den genomiska GBSS-genen för att uppnå en så effektiv inhibering av GBSS och därigenom av amyloproduktionen som möjligt. Antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen omfattar de delar av GBSS-genen som motsvarar sekvenser i regionen omfattande promotor samt ledarsekvens, translationsstart och första exon i antisens-riktning. För att få ett vävnadsspecifikt uttryck, dvs amyloproduktionen skall inhiberas enbart i potatisknölarna, används promotorer som är specifikt verksamma i potatisknölen. Härigenom påverkas inte stärkelsesammansättningen i andra delar av växten, vilket annars skulle kunna ge negativa bieffekter.

Uppfinningen omfattar således ett 342 bp antisens-fragment som i huvudsak har den i SEQ ID nr 1 angivna sekvensen. Sekvensen kan dock avvika från den angivna med något eller några ej intill varandra liggande baspar utan att fragmentets funktion påverkas.

Uppfinningen omfattar även en potatisknölspecifik promotor omfattande ca 1000 bp, vilken promotor hör till genen enligt uppfinningen som kodar för stärkelsekornbun-

det stärkelsesyntas. Varken promotorn eller tillhörande gen har tidigare karaktäriserats. En sekvens av 629 bp av promotorns ca 1000 bp är angiven i SEQ ID nr 2 medan genens sekvens är angiven i SEQ ID nr 3. Även promotorns och
5 genens sekvenser kan avvika från de angivna med något eller några ej intill varandra liggande baspar, utan att deras funktion påverkas.

Uppfinningen omfattar likaså vektorer vilka inbegriper antisens-fragmentet respektive antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen.
10

I andra aspekter omfattar uppfinningen celler, planter, knölar, mikroknölar respektive frön, vilkas genom innehåller fragmentet enligt uppfinningen insatt i antisens-riktning.

15 I ytterligare andra aspekter omfattar uppfinningen stärkelse av amylopektintyp, både nativ och derivatierad.

Slutligen omfattar uppfinningen ett förfarande för undertryckande av amylobildning i potatis, varigenom huvudsakligen stärkelse av amylopektintyp bildas i potatisen.
20

Uppfinningen beskrivs närmare med hjälp av bifogad figurer, vari

fig 1 visar principen för antisens-geninhibering ;

fig 2 visar resultatet av restriktionsanalys av potatis-GBSS-genen;
25

fig 3 visar antisens-konstruktionen pHoxWA (enligt Bevan, 1984);

fig 4 visar antisens-konstruktionen pHoxWC (enligt Bevan, 1984);

30 fig 5 visar en ny binär vektor pHo3 (enligt Bevan, 1984);

fig 6 visar antisens-konstruktionen pHoxWE (enligt Bevan, 1984).

Dessutom visas sekvenserna för de olika DNA-fragmenten enligt uppfinningen i SEQ ID nr 1, 2 och 3. Avvikelser från dessa sekvenser kan förekomma i något eller några j intill varandra liggande baspar.
35

MATERIAL

Vid det praktiska genomförandet av uppfinningen har följande material använts:

- Bakteriestammar: E. coli DH5alfa och DH5alfaF'IQ(BRL). E. coli JM105 (Pharmacia). A. tumefaciens LBA4404 (Clontech).
5 Vektorer: M13mp18 och mp19 (Pharmacia). pBI101 och pBI121 (Clontech). pBI240.7 (M. W. Bevan). pUC plasmider (Pharmacia).
Enzymer: Restriktionsenzymer och EcoRI linker (BRL).
10 UNIONTM DNA Ligation Kit (Clontech). SequenaseTM DNA Sequencing Kit (USB). T₄-DNA ligas (Pharmacia).

Ovan angivna material används i enlighet med av tillverkarna angivna specifikationer.

Genomiskt bibliotek

- 15 Ett genomiskt bibliotek i EMBL3 har producerats av Clontech för sökandens räkning med blad av potatissort n Bintje som utgångsmaterial.

Identifiering och isolering av GBSS-genen

- Det genomiska biblioteket har screenats för potatis-
20 -GBSS-genen med hjälp av cDNA-kloner för såväl 5'- som 3'-ändan av genen (vilka cDNA-kloner erhöles från M Hergersberger, Max Plankinstitutet i Köln) i enlighet med protokollet från Clontech.

- En fullängdsklon av potatis-GBSS-genen wx311 har
25 identifierats och isolerats ur det genomiska biblioteket. Början av GBSS-genen har bestämts till ett EcoRI-fragment och kallas fragment w (3,95 kb). Slutet av GBSS-genen har också bestämts till ett EcoRI-fragment, vilket kallas fragment x (5,0 kb) (fig 2). Fragmenten w och x har subklonats i pUC13 (Viera, 1982; Yanisch-Peron et al, 1985)
30 och betecknas pSw respektive pSx.

Karaktärisering av GBSS-genen i potatis

- GBSS-genen i potatis har karaktäriserats med hjälp av restriktionsanalys och cDNA-prober, varvid 5'- och 3'-ändar av GBSS-genen bestämts noggrannare (fig 2). Sekvensbestämning enligt Sanger et al, 1977, av GBSS-genen har gjorts på subkloner från pSw och pSx i M13mp18 och mp19
35

samt pUC19 med start kring 5'-änden (se SEQ ID nr 3).

Promotorregionen är bestämd till ett BglII-NsiI-fragment. (se SEQ ID nr 2). Transkriptions- och translationsstart har bestämts till ett överlappande BglII-HindIII-fragment. Terminatorregionen i sin tur är bestämd till ett SpeI-HindIII-fragment.

Antisens-konstruktioner för GBSS-genen i potatis

GBSS-genfragmentet enligt uppfinningen (se SEQ ID nr 1) har bestämts på följande sätt.

- 10 Restriktion av pSw med NsiI och HindIII ger ett 349 bp fragment, som subklonat i pUC19 kallas 19NH35. Vidare restriktion av 19NH35 med HpaI-SstI ger ett fragment innehållande 342 bp av GBSS-genen enligt uppfinningen. Detta fragment består av ledarsekvens, translationsstart samt de första 125 bp av den kodande regionen.

Antisens-konstruktionen pHoxWA: HpaI-SstI-fragmentet från 19NH35 har insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pBI121 (Jefferson et al, 1987) klyvd med SmaI-SstI.

- 20 Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av CaMV 35S-promotorn och termineras av NOS-terminatorn (NOS-nopalinsyntas). Den bildade antisens-konstruktionen pHoxWA (fig 3) har transformerats till Agrobacterium tumefaciens Stam LBA 4404 genom direkt transformation med "frys-upptinings"-metoden (Hoekema et al, 1983; An et al, 25 1988).

- Antisens-konstruktionen pHoxWC: I den binära vektorn pBI121, restriktionsklyvd med HindIII och SstI, har patatinI-promotorn insatts som ett HindIII-SmaI-fragment tillsammans med HpaI-SstI-fragmentet från GBSS 19NH35-fragmentet i antisens-riktning. PatatinI-promotorn, som är knölspecifik i potatis, kommer från vektorn pBI240.7, erhållen från M. Bevan, Institute of Plant Science Research i Norwich. Genom insättningen av patatinI-promotorn initieras transkriptionen av antisens-fragmentet med denna promotor, 35 medan den termineras av NOS-terminatorn. Konstruktionen av pHoxWC avslutas genom att en selektionsmarkör, t ex genen som kodar för beta-glukuronidas (GUS-genen) från pBI121,

— insätts som ett EcoRI-fragment med hjälp av länkmol kyler.

pHoxwC (fig 4) har i likhet med pHoxwA transformerats direkt till *Agrobacterium tumefaciens* stam LBA 4404 med hjälp av "frys-upptinings"-metoden (An et al, 1988).

- 5 Antisens-konstruktionen pHoxwE: Utgående från den binära vektorn pBI101 har en ny binär vektor, pHo3, konstruerats (fig 5). Denna vektor, som innehåller promotorn enligt uppfinningen (se SEQ ID nr 2) (GBSS-promotorn) till d n nu karaktäriserade potatis-GBSS-genen enligt uppfinning n,
- 10 har restriktionsklyvts med SmaI och SstI, varvid HpaI-SstI-fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning. Transkriptionen initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn. Detta innebär att pHoxwE uttrycks enbart i potatisknölen, eftersom GBSS-promotorn i likhet med patatinI-promotorn är knölspecifik.
- 15

Även i denna konstruktion har en selektionsmarkör i form av GUS-genen från pBI121 insatts som ett EcoRI-fragment med hjälp av länkmolekyler.

- pHoxwE (fig 6) har transformerats direkt till A. tumefaciens LBA 4404 enligt "frys-upptinings"-metoden (An et al, 1988).
- 20

Transformation

- Antisens-konstruktionerna överförs till bakterier, lämpligen medelst "frys-upptiningsmetoden" (An et al, 1988). Överföringen av den rekombinanta bakterien till potatisvävnad sker genom inkubation av potatisvävnaden med den rekombinanta bakterien i lämpligt medium eller det att någon form av skada tillförts potatisvävnaden. Under inkuberingen går T-DNA från bakterien in i värdväxtens DNA.
- 25
- 30 Efter inkuberingen dödas bakterierna och potatisvävnaden överförs på fast medium för kallusinduktion och inkuberas för kallustillväxt.

Efter lämpliga passager genom ytterligare medier bildas skott, vilka skärs bort från potatisvävnaden.

- 35 Som en första kontroll av att antisens-konstruktionerna har överförts till potatisvävnaden analyseras dessa med avseende på närvaron av GUS-genen där denna finns m d.

Ytt rligare kontroll r för t st av antisens-konstruktionernas expression samt överföring till potatisgenomet utförs med exempelvis southern och northern hybridisering (Maniatis et al (1982)). Antalet kopior av antisens-konstruktionen som överförts bestäms med southern hybridisering.

Kontrollen av expressionen på proteinnivå utförs lämpligen på mikroknölar inducerade in vitro på de transformerade skotten för att man så snabbt som möjligt skall kunna genomföra kontrollen.

Karaktärisering av GBSS-proteinet

Antisens-konstruktionernas inverkan på BSS-genens funktion med avseende på GBSS-proteinets aktivitet undersöks genom att stärkelse utvinnes ur mikroknölar och analyseras med avseende på närvaron av GBSS-proteinet. Vid elektrofores på polyakrylamidgel (Hovenkamp-Hermelink et al, 1987) bildar GBSS-proteinet ett distinkt band vid 60 kD då GBSS-genen är i funktion. Då GBSS-genen inte uttrycks, dvs då antisens-GBSS-genen uttrycks i full utsträckning så att bildningen av GBSS-protein inhiberas, påvisas inget 60 kD-band på gelen.

Karaktärisering av stärkelsen

Stärkelsesammansättningen i mikroknölar är identisk med den i vanliga potatisknölar och därför kan antisens-konstruktionernas inverkan på amyloproduktionen undersökas i mikroknölar. Förhållandet mellan amylos och amylopektin kan bestämmas med en spektrofotometrisk metod (enligt Hovenkamp-Hermelink et al, 1988).

Utvinning av amylopektin ur amylopektinpotatis

Amylopektinet utvinns ur den sk amylopektinpotatisen (potatis vari bildningen av amylos har undertryckts genom införandet av antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen) på känt sätt.

Derivativering av amylopektin

Beroende på amylopektinets slutliga användning kan dess fysikaliska och kemiska egenskaper förändras genom derivatisering. Med derivatisering avses här såväl kemisk

- som fysikalisk och enzymatisk behandling samt kombinationer av dessa (Modified starches).

Den kemiska derivatiseringen, dvs kemisk förändring av amylopektinet, kan ske på olika sätt, exempelvis genom
5 oxidation, syrahydrolys, dextrinisering, olika former av företring, t ex katjonisering, hydroxipropylering och hydroxietylering, olika former av förestring, t ex med vinylacetat, ätiksyraanhydrid, eller genom monofosfatering, difosfatering och oktenylsuccinering, samt kombinationer av
10 dessa.

Fysikalisk förändring av amylopektinet, kan exempelvis åstadkommas genom valstorkning eller extrudering.

Vid enzymatisk derivatisering utförs en nedbrytning (minskning av viskositeten) och kemisk modifiering av amy-
15 lopektinet med hjälp av förekommande enzymatiska system.

Derivatiseringen genomförs vid olika temperaturer, allt efter vilken slutprodukt man önskar framställa. Det vanliga temperaturområdet som man arbetar inom är 20-45°C, men temperaturer upp till 180°C kan användas.

20 Uppfinningen beskrivs närmare i följande exempel.

Exempel 1

Framställning av mikroknölar med insatta antisens-konstruktioner enligt uppfinningen

Antisens-konstruktionerna (se fig 3, 4 och 5) över-
25 förs till *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 med hjälp av "frys-upptättningsmetoden" (An et al, 1988). Överföringen till potatisvävnad utförs enligt ett modifierat protokoll enligt Rocha-Sosa et al (1989).

Bladdiskar från potatisplanter odlade in vitro inkuberas i mörker på flytande MS-medium (Murashige & Skoog; 1962) med 3% sackaros och 0,5% MES tillsammans med 100 µl av en suspension av rekombinant *Agrobacterium* per 10 ml medium i två dygn. Efter dessa två dygn dödas bakterierna. Bladdiskarna överförs på fast medium för kallusinduktion
35 och inkuberas i 4-6 veckor beroende på kallustillväxt. Det fasta mediet har följande sammansättning:

MS + 3% sackaros
 2 mg/l zeatinribosid
 0,02 mg/l "NAA"
 0,02 mg/l "GA₃"
 5 500 mg/l "Claforan"
 50 mg/l kanamycin
 0,25% "Gellan"

Härefter överförs bladdiskarna till ett medium m d
 annan hormonsammansättning, omfattande:

10 MS + 3% sackaros
 5 mg/l "NAA"
 0,1 mg/l "BAP"
 500 mg/l "Claforan"
 50 mg/l kanamycin
 15 0,25% "Gellan"

Bladdiskarna förvaras på detta medium i ca 4 veckor,
 varefter de överförs till ett medium där "Claforan"-kon-
 centrationen reducerats till 250 mg/l. Om det behövs flyt-
 tas bladdiskarna därefter över till färskt medium var 4:e
 20 till 5:e vecka. Efter skottbildning skärs skotten bort
 från bladdiskarna och överförs till ett identiskt medium.

Att antisens-konstruktionen har överförts till blad-
 diskarna kontrolleras först genom analys av närvaron av
 GUS-genen där denna är med. Bladextrakt från de regenera-
 25 rade skotten analyseras med avseende på glukuronidasakti-
 vitet med de substrat som beskrivits av Jefferson et al
 (1987). Aktiviteten påvisas genom visuell bedömning.

Ytterligare kontroller av antisens-konstruktionernas
 expression samt överföring därav till potatisgenomet ut-
 30 förs med southern och northern hybridisering enligt Mani-
 atis et al (1981). Antalet kopior av antisens-konstruk-
 tionerna som överförts bestäms med southern hybridisering.

När det konstaterats att antisens-konstruktionerna
 överförts till och uttryckts i potatisgenomet vidtar kont-
 35 rollen av expressionen på proteinnivå. För att inte behöva
 vänta på utvecklingen av en fullständig potatisplanta med
 potatisknölar utförs kontrollen på mikroknölar som induce-

rats in vitro på de transformerad skott n.

Stambitar av potatisskotten klipps av vid noderna och placeras på modifierat MS-medium. Där bildar de mikroknölar efter 2-3 veckor vid inkubering i mörker vid 19°C

- 5 (Bourque et al, 1987). Mediet har följande sammansättning:
MS + 6% sackaros

2,5 mg/l kinetin

2,5 mg/l "Gellan"

- Antisens-konstruktionernas inverkan på GBSS-gen ns
10 funktion med avseende på GBSS-proteinets aktivitet analyseras med hjälp av elektrofores på polyakrylamidgel (Hovenkamp-Hermelink et al, 1987). Stärkelse utvinns ur mikroknölar och analyseras med avseende på närvaron av GBSS-proteinet. I en polyakrylamidgel bildar GBSS-proteinet
15 ett distinkt band vid 60 kD då GBSS-genen är i funktion. Om GBSS-genen inte uttrycks, dvs då antisens-GBSS-genen uttrycks till fullo så att bildningen av GBSS-protein inhiberas, kan man inte se något 60 kD-band på gelen.

- Stärkelsesammansättningen, dvs förhållandet mellan
20 amylos och amylopektin, bestäms med en spektrofotometrisk metod enligt Hovenkamp-Hermelink et al (1988), varvid halten av respektive stärkelsekomponent bestäms utifrån standardkurva.

Exempel 2

- 25 Utvinning av amylopektin ur amylopektinpotatis

Potatis, vars huvudsakliga stärkelsekomponent utgörs av amylopektin, här kallad amylopektinpotatis, gentekniskt förändrad enligt uppfinningen, rivs så att stärkelsen friläggs från cellväggarna.

- 30 Cellväggarna (fibrerna) avskiljs från fruktsaft och stärkelse i centrisiler. Fruktsaften avskiljs från stärkelsen i två steg, nämligen först i hydrocykloner och därefter i speciellt konstruerade vakuumbandfilter.

- Därefter utförs en slutaffinering i hydrocykloner,
35 där resten av fruktsaften och fibrerna avskiljs.

— — — Produkten torkas i två steg, först genom en förtorkning på vakuumfilter och därefter en sluttorkning i varmluftström.

Exempel 3

5 Kemisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50%. pH-värdet justeras till 10,0-12,0 och en kvartär ammoniumförening tillsätts i en sådan mängd att slutprodukten får en substitutionsgrad av 0,004-0,2. Reaktionstemperaturen inställs till 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8, varefter produkten tvättas och torkas. På detta sätt erhålles det katjoniska stärkelsederivatet 2-hydroxi-3-trimetylammoniumpropyleter.

Exempel 4

15 Kemisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en vattenhalt av 10-25 vikt%. pH-värdet justeras till 10,0-12,0 och en kvartär ammoniumförening tillsätts i en sådan mängd att slutprodukten får en substitutionsgrad av 0,004-0,2. Reaktionstemperaturen inställs på 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8. Slutprodukten är 2-hydroxi-3-trimetylammoniumpropyleter.

Exempel 5

Kemisk derivatisering av amylopektin

25 Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50 vikt%. pH-värdet justeras till 5,0-12,0 och natriumhypoklorit tillsätts så att slutprodukten får önskad viskositet. Reaktionstemperaturen inställs på 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8, varefter slutprodukten tvättas och torkas. På detta sätt erhålles oxiderad stärkelse.

Exempel 6

Fysikalisk derivatisering av amylopektin

35 Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50 vikt%, varefter uppslamningen anbringas på en uppvärmd vals, där den torkas till en film.

Exempel 7

15

Kemisk och fysikalisk derivatis ring av amylopektin

Amylopektin behandlas enligt d förfaranden som beskrivs i något av exemplen 3-5 för kemisk modifiering och behandlas därefter vidare enligt exempel 6 för fysikalisk
5 derivatisering.

10

15

20

25

30

35

Litteraturreferenser:

- Mac Donald, F. D. och Preiss, J., 1985, Plant. Physiol. 78:849-852
- Preiss, J., 1988, In The Biochemistry of Plants 14 (Carbohydrates). Ed. J. Preiss, Academic Press; 181-254
- 5 - Echt, C. S. och Schwarz, D., 1981, Genetics 99:275-284
- Klösgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. och Saedler, H., 1986, Mol. Gen. Genet. 203:237-244
- Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Klösgen, R. B., Wi nand, 10 U., Peterson, P. A. och Saedler, H., 1984, EMBO J. 3(5):1021-1028
- Shure, M., Wessler, S. och Fedoroff, N., 1983, Cell 35:225-233
- Jacobsen, E., Kriggsheld, H. T., Hovenkamp-Hermelink, J. 15 H. M., Ponstein. A. S., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1990, Plant. Sci. 67:177-182
- Visser, R. G. F., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein A. S., Vos-Scheperkeuter, G. H., Jacobsen, E., Feenstra, W. J. och Witholt, B., 1987, Proc. 4th European 20 Congress on Biotechnology 1987, vol 2, Elsevier, Amsterdam; 432-435
- Vos-Scheperkeuter, G. H., De Boer, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. och Witholt, B., 1986, Plant. Physiol. 82:411-416
- 25 - Cornelissen, M., 1989, Nucleic Acids Res. 17(18):7203-7209
- Izant, J. G., 1989, Cell Motility and Cytoskeleton 14:81-91
- Sheehy; R. E., Kramer, M., Hiatt, W. R., 1988, Proc. 30 Natl. Acad. Sci. USA, 85(23):8805-8809
- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., de Lange, P., Gerats, A. G. M., Mol, J. N. M. och Stuitje, A. R., 1960, Mol. Gen. Genet. 220:204-212
- Flavell, R. B., 1990, AgBiotech. News and Information 35 2(5):629-630
- Hergersberger, M., 1988, Molekulare Analyse des waxy Gens aus Solanum tuberosum und Expression von waxy

- antisense RNA in transgener. Kartoffeln. Doktoravhandling från Universitetet i Köln.
- Visser, R. G. F., Hergersberger, M., van der Leij, F. R., Jacobsen, E., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1989, Plant. Sci. 64:185-192
 - 5 An, G., Ebert, P. R., Mitra, A. och Ha, S. B., 1987, Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19
 - Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. och Schilperoort, R. A., 1983, Nature 303:179-180
 - 10 - Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. och Bevan, M. W., 1987, EMBO J. 6:3201-3207
 - Sanger, F., Nicklen, S. och Coulson, A. R., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467
 - Viera, J. och Messing, J., 1982, Gene 19:259-268
 - 15 - Yanisch-Perron, C., Viera, J. och Messing, J., 1985, Gene 33:103-119
 - Murashige, T. och Skoog, F., 1962, Physiol. Plant 15:473-497.
 - Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Shell, J. och Willmitzer, L., 1989, EMBO J., 8(1):23-29
 - 20 - Jefferson, R. A., Kavanagh, R. A. och Bevan, M. W., 1987, EMBO J. 6:3901-3907
 - Maniatis, T., Fritsch, E. F. och Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
 - 25 - Bourque, J. E., Miller, J. C. och Park, W. D., 1987, In Vitro Cellular & Development Biology 23(5):381-386
 - Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponst in, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B. J. & Feenstra, W. J., 1987, Theor. Appl. Genet. 75:217-221
 - Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., de Vries, J. N., Adamsa, P., Jacobsen, E., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1988, Potato Research 31:241-246
 - 35 - Modified starches: Properties and use D. B. Wurzburg
 - Bevan, M. W., 1984. Nucleic Acids Res. 12:8711-8721.

18

SEQ ID nr 1

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis i antisens-riktning

Sekvenslängd: 342 bp

TGCATGTTTC CCTACATTCT ATTTAGAATC GTGTTGTGGT GTATAAACGT	50
TGTTTCATAT CTCATCTCAT CTATTCTGAT TTTGATTCTC TTGCCTACTG	100
TAATCGGTGA TAAATGTGAA TGCTTCCTTT CTTCTCAGAA ATCAATTTCT	150
GTTTTGTTTT TGTTTCATCTG TAGCTTATTC TCTGGTAGAT TCCCCTTTTT	200
GTAGACCACA CATCAC ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC	243
Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His	
1 5	
TTT GTG TCA AGA AGC CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC	285
Phe Val Ser Arg Ser Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr	
10 15 20	
TTG TCA CAG ATA GGA CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT	327
Leu Ser Gln Ile Gly Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn	
25 30 35	
GGT TTA AGG GCT GTT	342
Gly Leu Arg Ala Val	
40	

19

SEQ ID nr 2

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: Promotor till GESS-genen från potatis

Sekvenslängd: 629 bp

AACCATCCTT	CCTTTTAGCA	GTGTATCAAT	TTTGTAATAG	AAJCATGCAT	50
ACTCAATCTT	AATACTAAAA	TGCAACTTAA	TATAGGCTAA	ACCAAGTAAA	100
GTAATGTATT	CAACCTTTAG	AATTGTGCAT	TCATAATTAG	ATCTTGTTTG	150
TCGTAAAAAA	TTAGAAAATA	TATTTACAGT	AATTTGGAAT	ACAAAGCTAA	200
GGGGGAAGTA	ACTAATATTC	TAGTGGAGGG	AGGGACCAGT	ACCAGTACCT	250
AGATATTATT	TTTAATTACT	ATAATAATAA	TTTAATTAAC	ACGAGACATA	300
GGAAATGTCAA	GTGGTAGCGT	AGGAGGGAGT	TGGTTTAGTT	TTTTAGATAC	350
TAGGAGACAG	AACCGGACGC	CCCATTGCAA	GGCCAAGTTG	AAGTCCAGCC	400
GTGAATCAAC	AAAGAGAGGG	CCCATAATAC	TGTCGATGAG	CATTTCCTTA	450
TAATACAGTG	TCCACAGTTG	CCTTCTGCTA	AGGGATAGCC	ACCCGCTATT	500
CTCTTGACAC	GTGTCACTGA	AACCTGCTAC	AAATAAGGCA	GGCACCTCCT	550
CATTCTCACT	CACTCACTCA	CACAGCTCAA	CAAGTGGTAA	CTTTTACTCA	600
TCTCCTCCAA	TTATTTCTGA	TTTCATGCA			629

20

SEQ ID nr 3

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genen från potatis

Sekvenslängd: 2191 bp

AACCATCCTT	CCTTTGTAGCA	GTGTATCAAT	TTTGTAAATAG	AACCATGCAT	50
ACTCAATCCTT	AATACTAAAA	TGCAACTTAA	TATAGGCTAA	ACCAAGTAA	100
GTAATGTATT	CAACCTTTAG	AATTGTGCAT	TCATAATTAG	ATCTTGTTG	150
TCGTAAAAAA	TTAGAAAATA	TATTTACAGT	AAATTGGAAT	ACAAAGCTAA	200
GGGGGAAGTA	ACTAATATTC	TAGTGGAGGG	AGGGACCAGT	ACCAGTACCT	250
AGATATTATT	TTTAATTACT	ATAATAATAA	TTTAATTAAAC	ACGAGACATA	300
GGAATGTCAA	GTGGTAGCGT	AGGAGGEGAGT	TGGTTTAGTT	TTTTAGATAC	350
TAGGAGACAG	AACCGGACGG	CCCATTGCAA	GGCCAAGTTG	AAGTCCAGCC	400
GTGAATCAAC	AAAGAGAGGG	CCCATAATAC	TGTCGATGAG	CATTTCCCTA	450
TAATACAGTG	TCCACAGTTG	CCTTCTGCTA	AGGGATAGCC	ACCCGCTATT	500
CTCTTGACAC	GTGTCACTGA	AACCTGCTAC	AAATAAGGCA	GGCACCTCCT	550
CATTCTCACT	CACTCACTCA	CACAGCTCAA	CAAGTGGTAA	CTTTTACTCA	600
TCTCCTCCAA	TTATTTCTGA	TTTCATGCAT	GTTTCCCTAC	ATTCTATTTA	650
GAATCGTGTT	GTGGTGTATA	AAGTTTGTTT	CATATCTCAT	CTCATCTATT	700
CTGATTTTGA	TTCTCTTGCC	TACTGTAATC	GGTGATAAAT	GTGAATGCCT	750
CCTTTCTTCT	CAGAAATCAA	TTTCTGTTTT	GTTTTTGTTT	ATCTGTAGCT	800
TATTCTCTGG	TAGATTCCCC	TTTTTGTTAGA	CCACACATCA	C ATG GCA	847

Met Ala

1

AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC TTT GTG TCA AGA AGC CAA ACT	889
Ser Ile Thr Ala Ser His His Phe Val Ser Arg Ser Gln Thr	
5 10 15	

TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC TTG TCA CAG ATA GGA CTC AGG	931
Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr Leu Ser Gln Ile Gly Leu Arg	
20 25 30	

AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT GGT TTA AGG GCT GTT AAC AAG	973
Asn His Thr Leu Thr His Asn Gly Leu Arg Ala Val Asn Lys	
35 40	

CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA ACA CCC	1015
Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val Thr Pro	
45 50 55	

AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA TGC TCA	1057
Lys Met Ala Ser Arg Thr Gln Thr Lys Arg Pro Gly Cys Ser	
60 65 70	

GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC TTT GTG	1099
Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile Phe Val	
75 80 85	

GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA CTA GGT	1141
Gly Thr Gln Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly Leu Gly	
90 95 100	

GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA	1174
Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala	
105 110	

GTAAAGTCCTT CTTTCATTTG GTTACCTACT CATTTCATTAC TTATTTTGTT	1224
TAGTTAGTTT CTACTGCATC AGTCTTTTTA TCATTTAG GCC CGC GGA	1271
Ala Arg Gly	
CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA	1313
His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys	
115 120 125	
GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC	1353
Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu	
130 135	
CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTCTT GATTCAAGAA	1403
TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT	1448
Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val	
140 145	
CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT	1490
Arg Phe Ile His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe	
150 155 160	
GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT	1527
Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys	
165 170	
TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT	1577
ATCTTTTAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTAAAG GTT TGG GGC AAA	1625
Val Trp Gly Lys	
175	
ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT	1667
Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr	
180 185	
CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA	1703
Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln	
190 195 200	
GTAAAGTTAGT TACTCTTGAT TTATATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT	1753
AATCGTTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT	1799
Ala Ala Leu Glu Ala Pro	
205	
AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA	1841
Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro	
210 215 220	
TAT G GTAAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAAACCT CCTTACTATA	1885
Tyr G	
TCATTGTAGG TAATCATCTT TATT TGCCT ATTCTGTCAG GA GAG GAT	1933
ly Glu Asp	
225	

GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GTT CTC ATT CCT 1975
Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Val Leu Ile Pro
230 235

TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG 2017
Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu
240 245 250

AAT GCC AAG GTAAAAATTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA 2056
Asn Ala Lys
255

CGTTACCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTTCA	2106
TTGCCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA	2149
Vai Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln	
260	265

GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT 2191
Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro
270 275 280

PATENTKRAV

1. 342 bp fragment av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas (GBSS) i potatis med väsentligen den i antisens-riktning insatta nukleotidsekvensen som anges i SEQ ID nr 1.

2. Promotor till genen för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas (GBSS) i potatis, vilken promotor är knölspecifik och har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 2.

3. Gen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas i potatis (GBSS-genen) som har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 3.

4. Antisens-konstruktion för inhibering av uttryck av genen för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas i potatis omfattande

- a) en promotorsekvens,
- b) ett 342 bp-fragment av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas, insatt i antisens-riktning, vilket fragment har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 1.

5. Antisens-konstruktion för inhibering av uttrycket av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas (GBSS-genen) i potatis, omfattande

- a) en promotorsekvens,
- b) ett 342 bp-fragment av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas insatt i antisens-riktning, vilket har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 1,
- c) ett genfragment som kodar för β -glukuronidas (GUS-genen).

6. Antisens-konstruktion enligt krav 4 eller 5, kännetecknad av att promotorn har väsentligen den sekvens som anges i SEQ ID nr 2.

7. Antisens-konstruktion enligt krav 4 eller 5, kännetecknad av att promotorn är vald bland CAMV 35S-promotorn och patatinI-promotorn.

8. Vektor omfattande ett 342 bp antisens-fragment med väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 1.
9. Vektor omfattande antisens-konstruktionen enligt något av kraven 4-7.
- 5 10. Cell av potatisplanta, vars genom omfattar antisens-fragmentet enligt krav 1.
11. Potatisplanta, vars genom omfattar antisens-fragmentet enligt krav 1.
12. Potatisknölar, vilkas genom omfattar antisens-
10 -fragmentet enligt krav 1.
13. Frön från potatisplanta, vilkas genom innehåller antisens-fragmentet enligt krav 1.
14. Mikroknölar av potatis, vilkas genom omfattar antisens-fragmentet enligt krav 1.
- 15 15. Nativ stärkelse av amylopektintyp, känd som t e c k n a d av att den erhållits från potatis som förändrats gentekniskt för undertryckande av bildning av stärkelse av amylostyp.
16. Derivatiserad stärkelse av amylopektintyp,
20 känd som t e c k n a d av att den utgöres av stärkelse av amylopektintyp som utvunnits ur potatis, vilken modifierats gentekniskt för undertryckande av bildning av stärkelse av amylostyp, vilken stärkelse av amylopektintyp därefter har derivatiserats på kemisk, fysikalisk eller
25 enzymatisk väg.
17. Förfarande för undertryckande av amylobildning i potatis, känd som t e c k n a t av att potatisen förändras gentekniskt genom att man i potatisvävnadens genom inför en genkonstruktion omfattande ett 340 bp fragment av
30 den potatisgen som kodar för bildning av stärkelsekornbundet stärkelsesyntas (GBSS-genen) insatt i antisens-riktning, vilket fragment har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 1, tillsammans med en promotor till GBSS-genen.

SAMMANDRAG

5 Genteknisk förändring av potatis för undertryckand
av bildning av stärkelse av amylostyp beskrivs.

 Ett 342 bp antisens-fragment för insättning i pota-
tisenomet beskrivs också. Vidare beskrivs antisens-konst-
ruktioner, gener och vektorer omfattande nämnda antisens-
10 -fragment. Likaså beskrivs en promotor till genen som ko-
dar för bildning av stärkelsekornbundet stärkelsesyntas.

 Även celler, plantor, knölar, mikroknölar och frön av
potatis omfattande nämnda antisens-fragment beskrivs.

 Slutligen beskrivs stärkelse av amylopektintyp, både
15 nativ och derivatiserad, härrörande från den gentekniskt
förändrade potatisen, liksom ett förfarande för under-
tryckande av amylosbildning i potatis.

20

25

30

35

Publ.bild: fig 1

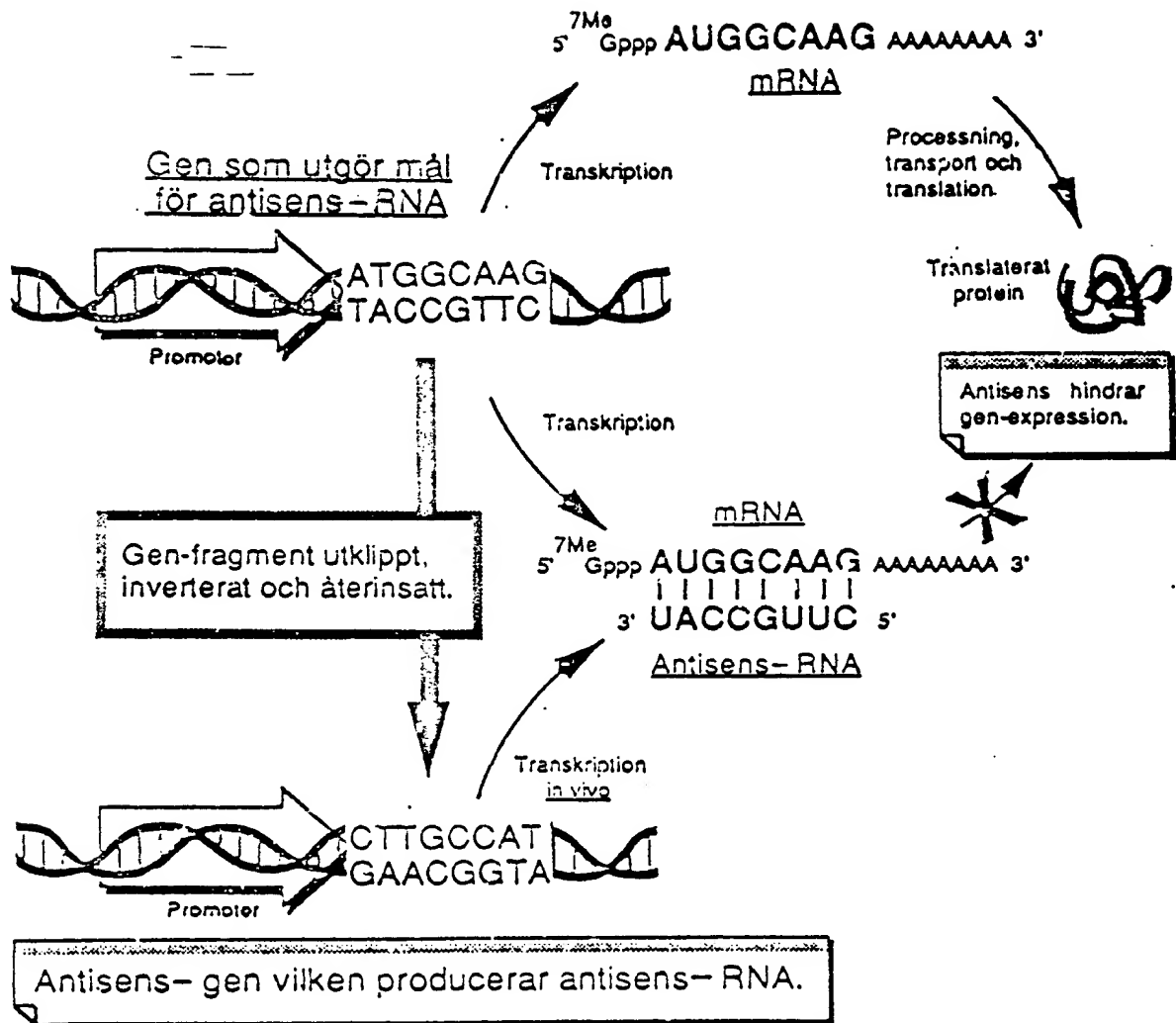
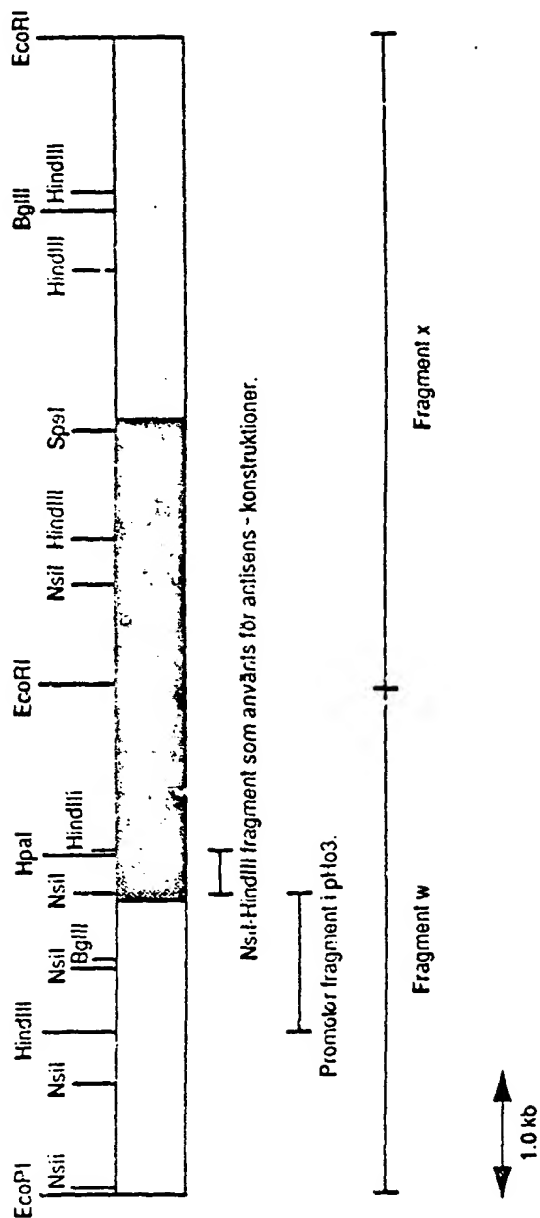
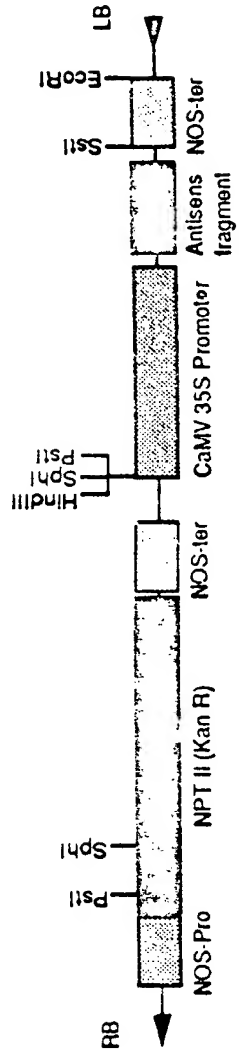


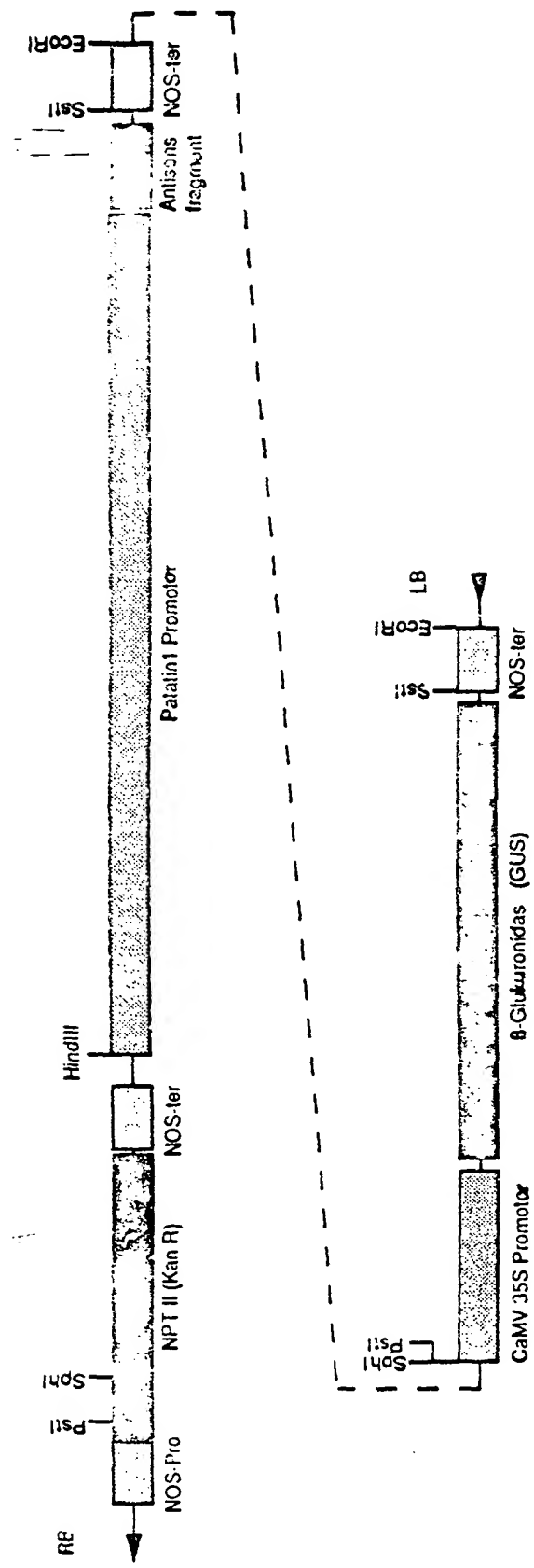
FIG 1



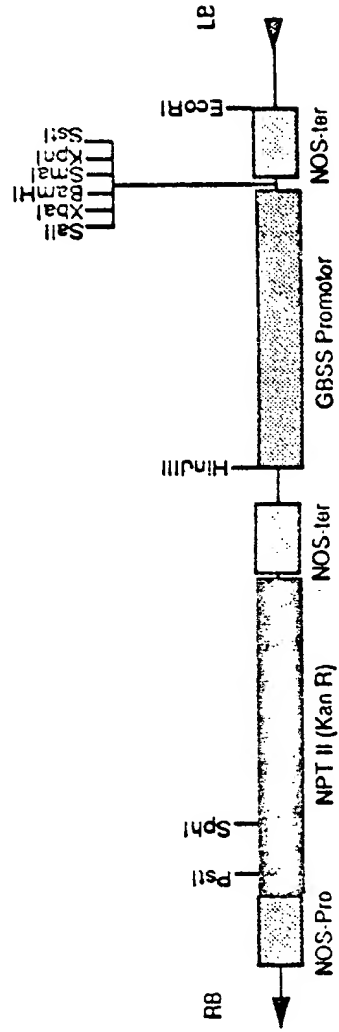
Figur 2: Resultat av restriktionsanalys. GBSS kodande region inklusive introner är markerat med en mörkare ton.



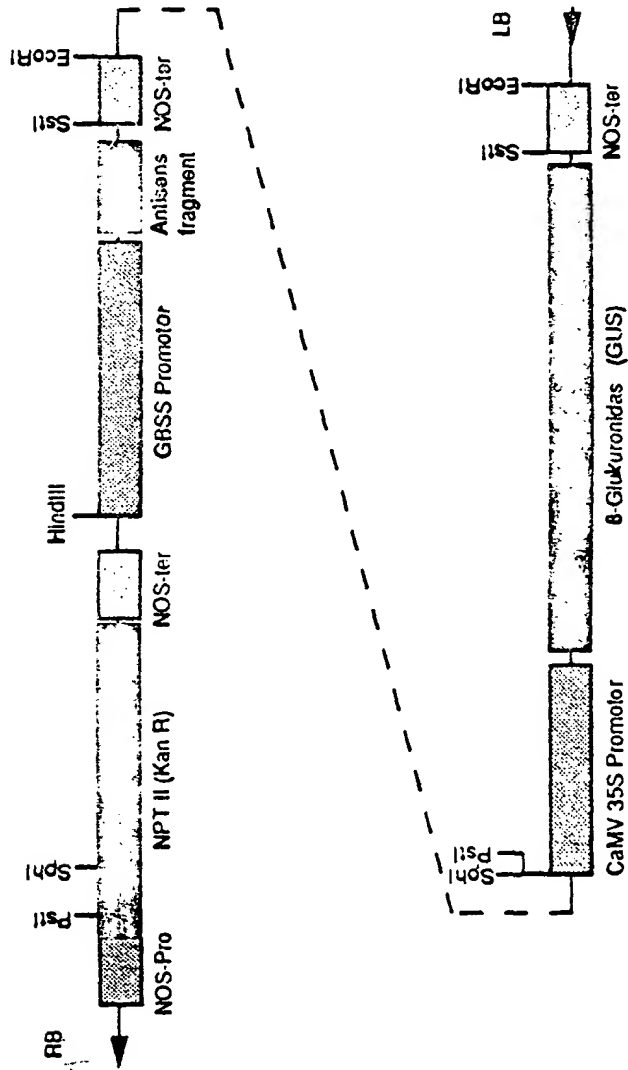
Figur 3: pHoxwA. Utanför RB och LB som pBIN19



Figur 4: pHoxwC. Utanför RB och LB som pBIN19



Figur 5: pHo3. Utanför RB och LB som pBIN19



Figur 6: pHoxwE. Utanför RB och LB som pBIN19

